

ODDELEK ZA ŽIVILSTVO
UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA



PRAKTIKUM iz MIKROBNE EKOLOGIJE
za študente BIOLOGIJE

David Stopar, Duško Odić, Ivan Mahne

Ljubljana, 2005

KAZALO

UVOD	2
MIKROBNI METABOLIZEM	2
Mikrobni prehranjevalni spleti in kroženje snovi	3
EKSPERIMENTALNE METODE	4
Določanje skupnega števila mikroorganizmov z metodo najbolj verjetnega števila (MPN metoda)	5
Plinska kromatografija in merjenje produkcije CO ₂	7
MIKROBNE PRETVORBE OGLJIKA	9
Vaja 1: Založenost okolja s hranili in razgradnja celuloze	11
Vaja 2: Mineralizacija celuloze	13
Vaja 3: Amiloliza - velikost združbe amilolitičnih mikroorganizmov	14
Vaja 4: Učinkovitost mikrobne porabe škroba	15
Vaja 5: Proteoliza - velikost združbe proteolitičnih mikroorganizmov	17
MIKROBNE PRETVORBE DUŠIKA	18
Vaja 6: Mineralizacija dušika - velikost mikrobne združbe	20
Vaja 7: Nitrifikacija - velikost združbe nitrifikatorjev	21
Vaja 8: Vpliv kisika na nitrifikacijo	22
Vaja 9: Vloga pH pri nitrifikaciji	22
Vaja 10: Denitrifikacija - velikost združbe denitrifikatorjev	23
Vaja 11: Denitrifikacija pri standardni "aerobni" inkubaciji	24
Vaja 12: Talna pogača	25
MIKROBNE PRETVORBE ŽVEPLA	26
Vaja 13: Anaerobna mineralizacija organskega žvepla - velikost mikrobne združbe	27
Vaja 14: Sulfatna respiracija - velikost mikrobne združbe	28
Vaja 15: Sulfatna respiracija pri standardni "aerobni" inkubaciji	29
MPN - Mc Crady-jeva tabela za 3 ponovitve	31
LITERATURA	32
PRILOGA	33

1 UVOD

Mikrobna ekologija je veda, ki preučuje interakcije mikroorganizmov z drugimi organizmi in s fizikalno-kemijskimi dejavniki okolja. V ekosistemu se nahajajo mikrobi povsod, kjer lahko prihaja do energetskih transformacij. V okolju zasedejo določeno **ekološko nišo**. S tem izrazom pojmujeemo skupno celoto okolja organizma, njegovega položaja v prehranjevalnem spletu, njegove dejavnosti in ekološko vlogo v strukturi in funkciji združbe. Posamezni mikroorganizem najdemo v večjem številu v naravnem okolju le v taki ekološki niši, kjer lahko zaradi posebnosti v prehranjevanju izrablja svojo prednost pred ostalimi mikroorganizmi. Zaradi omejenega števila ekoloških niš in medsebojnega prekrivanja le-teh prihaja med mikroorganizmi do tekmovanja za prostor in hrano. Mikroorganizmi so v naravnem okolju izmenično v stanju energetskega obilja ali pa energetske lakote. Daljša obdobja eksponentne rasti, ki so značilna za namnoževanje mikroorganizmov v laboratoriju, so v naravi redka.

Mikrobi imajo običajno poleg osnovne metabolne poti odprte možnosti tudi za rast na drugih energetskih virih. Večina heterotrofnih mikrobov lahko izkorišča n.pr. glukozo kot vir energije, bistveno manj pa je takih, ki lahko poleg glukoze izkoriščajo tudi celulozo. Če sta v okolju na voljo glukosa in celuloza kot vira energije, bo v sistemu najprej porabljena glukosa, nadaljna rast mikroorganizmov pa bo vezana na možnost izrabe celuloze. Mikrobi, ki lahko izrabljajo glukozo in celulozo, bodo v tem primeru imeli prednost.

V svoji primarni ekološki niši ima mikroorganizem največje možnosti za preživetje, le-to pa ni zagotovljeno, ker se v mikrookolju oz. na mikroskali pogoji lahko hitro spreminjajo in postanejo neoptimalni in s tem **omejujoči** – če se jim mikrob ne prilagodi, lahko propade. Ti dejavniki so lahko fizikalni (temperatura, pH, tlak, vlaga), kemijski (dostopnost hranil za prehranske in energetske potrebe) ali biološki (prisotnost parazitov, plenilcev).

2 MIKROBNI METABOLIZEM

Pri biokemijskih poteh, v katerih pride do oksidacije različnih donorjev elektronov in tvorbe ATP, glede na različne **elektronske akceptorje** (in s tem različno energetsko učinkovitost) ločimo **respiracijo** in **fermentacijo**. Pri respiraciji elektronske akceptorje organizmi privzemajo iz okolice, pri fermentaciji pa so akceptorji vmesni produkti oksidacije substrata. Tako ni potrebe po zunanjem akceptorju elektronov, zaradi nepopolne oksidacije substrata pa je energetski izplen pri fermentaciji manjši kot pri respiraciji. Pri **aerobni** respiraciji je energetski izplen večji kot pri **anaerobni**, ker je redoks potencial kisika večji od redoks potencialov drugih akceptorjev elektronov in se med prenosom elektronov od primarnega donorja do terminalnega akceptorja sprosti največ energije.

Tabela 1: Pregled oblik metabolizma in metabolnih razredov organizmov

vir C	vir energije		
	svetloba <fototrofi>	anorganske spojine <kemotrofi>	organske spojine <kemotrofi>
anorganski (CO ₂ , HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻) <avtotrofi>	fototrofni evkarionti; cianobakterije (H ₂ O je donor e ⁻) škrlatne in zelene bakterije (H ₂ S ali H ₂ je donor e ⁻)	kemolitotrofi: vodikove, žveplove in nitrifikacijske bakterije	(ni znanega primera)
organski <heterotrofi>	škrlatne in zelene bakterije, ki izrabljajo organski vir C (fotoheterotrofi)	miksotrofi	kemoorganotrofi (večina prokariontov in vsi nefototrofni evkarionti)

Oksidirane anorganske spojine (npr. nitrat, sulfat, CO₂) lahko reducirajo številni organizmi. Če jim te spojine služijo kot vir elementov, potrebnih za rast, govorimo o **asimilativnem metabolizmu**. Pri asimilativnem metabolizmu redukcija poteka le do tiste stopnje, ki je potrebna za rast ter vodi k nastanku produktov, ki se vgrajujejo v makromolekule. Pri **disimilativnem metabolizmu** pa te spojine služijo kot elektronski akceptorji, njihova redukcija pa vodi k nastanku ATP. Pri disimilativnem metabolizmu se reducirani končni produkti izločijo v okolje.

Mikrobni prehranjevalni spleti in kroženje snovi

Za delovanje ekosistemov je bistven pretok energije skozi **prehranjevalne splet**e. V prehranjevalnih spletih ločimo različne **ekološke skupine** organizmov: (1) **primarni producenti** iz vode, CO₂ in mineralnih hranil izdelujejo organske snovi za lastno biomaso; te organske snovi so hrana za (2) **primarne** in **sekundarne potrošnike**; (3) **razkrojevalci** razgradijo odmrle organizme, njihove izločke in odpadne dele, in v procesu pretvorbe kompleksnih organskih spojin v preproste anorganske spojine (proces **mineralizacije**) v sistem vračajo hranila, ki jih lahko ponovno uporabijo primarni producenti.

Kroženje snovi je v naravi nujno potrebno zato, ker so viri prisotni v omejenih količinah. Zlasti pomembna so kroženja elementov, iz katerih so organizmi zgrajeni: **C, O, H, N, P** in **S**. Ti elementi so **makroelementi** – predstavljajo 97 % teže organizmov. Preostali makroelementi so **K, Mg, Na, Ca** in v manjših količinah **Fe**. **Mikroelementi** so ravno tako pomembni, vendar se pojavljajo v znatno manjših količinah: Cr, Co, Cu,

Mn, Mo, Ni, Se, W, V in Zn. Mikroorganizmi so zaradi svoje splošne razširjenosti v biosferi ključni v biogeokemičnem kroženju elementov, ki omogoča življenje na planetu.

Energija se pretaka skozi ekosistem večinsko **enosmerno**. V sistem vstopa kot **radiacijska energija**, ki se v fotosintezi pretvori v **kemično energijo** vezi v organskih molekulah. Skozi prehranjevalne spletke prehaja energija od organizma do organizma in se vgrajuje v različne biološke strukture, izkoristek pa ni nikoli 100 %, ampak se količina kemijsko vezane (uporabne) energije, ki jo dani heterotrofni organizem prejme s konzumacijo organizma z nižjega trofičnega nivoja, zmanjšuje. Vzroki so v tem, da organizmi ne konzumirajo vse hrane, ki je teoretično na voljo, niti ne izkoristijo vse hrane, ki jo pojedjo, za sintezo nove biomase – del energije se sprošča (izgublja) kot toplota in se ne more prenesti v naslednji trofični nivo. Zato govorimo o enosmernem pretoku energije skozi prehranjevalne verige (in ne o kroženju energije). Vsak organizem izkoristi približno 10 % razpoložljive energije iz hrane.

Izmenjavo elementov v naravi med neživim delom ekosistema (atmosfera, tlemi, vodo) in organizmi, skupaj s pretvorbami, ki jih organizmi vršijo, imenujemo **biogeokemično kroženje elementov**. Elementi med mikrobno posredovanim kroženjem spreminjajo svoje oksidacijsko stanje – prehajajo iz oksidiranih oblik v reducirane, in obratno. Kroženje elementov pa zajema tudi premeščanje elementov v samem ekosistemu in med njimi. Oksido-redukcijske pretvorbe lahko potekajo s pomočjo organizmov ali pa kemično. Kemične pretvorbe so običajno bistveno (10^{10} -krat) bolj počasne kot biološke, včasih pa so lahko hitre (npr. kemijska oksidacija Fe^{2+} v Fe^{3+} v prisotnosti O_2 in alkalnem okolju). V primerih, ko sta možni kemijska in biološka pretvorba, pride med obema do kompeticije. Hitrost teh pretvorb je v veliki meri odvisna od udeležnosti katalizatorjev, ki so v živih celicah encimi. Če reakcije potekajo brez katalizatorjev, se hitrost nastajanja produktov bistveno upočasni. Zaradi vsesplošne prisotnosti mikroorganizmov (biokatalize) v okolju je pri danih pogojih na planetu običajno prednostno biološko kroženje elementov.

3 EKSPERIMENTALNE METODE

Pri poskusih z naravnimi vzorci se soočamo z naslednjimi težavami: (1) **reprezentativnost vzorca** – le-ta naj bi predstavljal sliko razmer v naravi, zato je zelo pomembno, kako in kje vzorčimo; (2) **stabilnost vzorca oz. spreminjanje stanja** – z manipulacijo vzorca se spreminjajo fizikalno-kemijske razmere, kar lahko vpliva na naravno združbo, zlasti mikroorganizmov, katerih neposredno okolje predstavlja že nekaj mm^3 ; mikrookolje, ki je v času merjenja aerobno, lahko zaradi metabolizma mikroorganizmov hitro preide v anaerobno okolje; zaradi hitrega spreminjanja stanja v naravnih sistemih so smiselni samo tisti podatki o aktivnosti mikroorganizmov, ki so dobljeni v obdobju znotraj relativne stabilnosti okolja; (3) **izbira metode za preučevanje naravne mikrobne združbe** – le majhen delež mikroorganizmov ($\sim 1\%$) iz narave lahko gojimo v laboratoriju, z umetnimi gojišči pa umetno selekcioniramo le določene populacije mikrobov, ostale pa zanemarimo.

V mikrobni ekologiji nas pri preučevanju globalnih metabolnih procesov bolj kot

posamezne populacije mikroorganizmov zanimajo celotne združbe, ki vršijo nek proces, in sicer njihova **številčna zastopanost** in **metabolna aktivnost**. Številčnost mikroorganizmov ugotavljamo z neposrednimi metodami (npr. direktno štetje pod mikroskopom) in s posrednimi metodami. Med posredne metode štejemo gojitvene tehnike, kakršne so npr. viabilno štetje oz. **štetje kolonijskih enot** (CFU) na trdnih gojiščih, in **določanje najbolj verjetnega števila celic** (MPN) v tekočih gojiščih. Aktivnost mikroorganizmov lahko posredno določamo s tem ko ugotavljamo **prirast biomase** (npr. z določanjem povečanja celičnega proteina v vzorcu), **porabo metabolnega substrata** ali pa **nastanek metabolnega produkta** v določenem časovnem intervalu. Z metodo MPN lahko preko določanja specifičnih metabolnih produktov ocenimo velikost združbe. Z ustrezno predhodno obdelavo vzorca (npr. odstranjevanje rastlinskih ostankov iz talnega vzorca) in z vključevanjem ustreznih **kontrolnih variant** (npr. inkubacije brez dodanega inokuluma) zagotovimo, da rezultati dejansko kažejo na mikrobno aktivnost. Vplive posameznih dejavnikov na nek proces ugotavljamo tako, da te dejavnike spreminjamo, vse ostale pa ohranjamo konstantne (npr. ugotavljanje omejujočega dejavnika s postopnim dodajanjem hranil, ugotavljanje vpliva kisika z aerobno oz. anaerobno inkubacijo, ugotavljanje vpliva pH s spreminjanjem pH v gojišču).

Metode proučevanja mikrobne aktivnosti morajo biti prilagojene majhnosti mikrobov in kompleksnosti njihovega okolja. Merjenje mikrobiološke aktivnosti v okolju otežujejo sočasne kemične in fizikalne pretvorbe spojin in elementov. Temu problemu se skušamo izogniti tako, da kot kontrolo uporabimo sterilni material, kjer preprečimo biološko aktivnost. Zagotovitev sterilnosti pa je v naravnem okolju zelo težavna naloga. Npr., sterilizacija tal z avtoklaviranjem lahko poruši fizikalne lastnosti vzorca, kot je struktura mineralov glin. Kljub temu, da je tak material sterilen, ni več primerljiv z materialom iz naravnega okolja mikroorganizma.

Določanje skupnega števila mikroorganizmov z metodo najbolj verjetnega števila (MPN metoda)

Metodo uporabljamo v tistih primerih, ko mikroorganizmov ni možno gojiti na trdnem gojišču in tudi, če je kinetika rasti med mikrobnimi vrstami zelo različna in obstoja nevarnost preraščanja kolonij. Zlasti pa jo uporabljamo takrat, ko želimo v kompleksnem sistemu določiti številčno zastopanost izbrane skupine mikroorganizmov. V teh primerih uporabimo selektivna ali diferencialna gojišča. Na namnoževanje mikroorganizmov kažejo znaki rasti v tekočem gojišču, tvorba metabolnih produktov, poraba substrata.

Priprava razredčitev: Aseptično odvzeti vzorec tal (10 g) suspendiramo v 90 ml sterilne fiziološke rastopine (0,9 % NaCl). Suspenzijo stresamo 1 uro na stresalniku (100 obr/min). Ta suspenzija je razredčitev vzorca 10^{-1} . S sterilno pipeto (oz. pipetnim nastavkom) aseptično prenesemo 1 ml tekoče faze iz razredčitve 10^{-1} v epruveto z 9 ml sterilne fiziološke raztopine in dobro premešamo – to je razredčitev 10^{-2} . Zamenjamo pipeto (oz. pipetni nastavek) in na enak način iz razredčitve 10^{-2} pripravimo razredčitev 10^{-3} . Po enakem postopku pripravimo še ostale zaporedne razredčitve vzorca.

Nacepljanje: Razredčitve vzorca tal nacepimo v izbrano tekoče gojišče v treh ponovitvah. Nacepimo tako, da s sterilno pipeto odpipetiramo 1 ml razredčitve 10^{-7} v gojišče v epruveti z oznako 10^{-7} . Na enak način naredimo vse tri ponovitve. Ko smo trikrat nacepili 10^{-7} razredčitev, z isto pipeto odpipetiramo 1 ml razredčitve 10^{-6} v gojišče z oznako 10^{-6} ter to ponovimo še dvakrat. Nacepljanje ostalih razredčitev opravimo po enakem postopku.

Za kontrolo nacepimo enako gojišče s sterilno fiziološko rastopino.

Inkubacija in odčitavanje rezultatov: nacepljena gojišča inkubiramo pri 28°C , nekaj tednov v temi. Po inkubaciji ugotovimo rast mikrobov v posameznih nacepitvah (primerjamo s kontrolo). Znaki rasti v tekočem gojišču so: motnost, usedlina, mrenica, sprememba barve, sprememba pH vrednosti gojišča, če smo dodali v gojišče pH indikator. Nacepitve, ki kažejo znake rasti, označimo s "+", tiste, kjer rast ni opazna, pa z "-". Iz razporeda + in - primerov določimo karakteristično število, ki je pri izvedbi s tremi ponovitvami 3-mestno. Karakteristično število zajema število pozitivnih primerov pri razredčitvah v prehodnem območju, to je od vseh pozitivnih do vseh negativnih ponovitev.

Najbolj verjetno število mikrobov v vzorcu določimo z uporabo primernih statističnih tabel (npr. Mc Crady-jeva tabela).

Primer:

ponovitve	razredčitve					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
a	+	+	+	-	-	-
b	+	+	+	+	+	-
c	+	+	+	+	-	-
			3	2	1	
			(karakteristično število)			

Na osnovi karakterističnega števila iz tabel odčitamo število mikroorganizmov v 1 ml vzorca z upoštevanjem razredčitve. V prikazanem primeru je tabelarična vrednost 15, torej je MPN vrednost $15 \cdot 10^3/\text{ml}$.

Določanje MPN v mikrotitrskih ploščah poteka po enakem principu, s to razliko, da ne pripravljamo redčitvene vrste inokuluma v fiziološki raztopini, ampak inokulum redčimo s prenašanjem med posameznimi kolonami na plošči. V vsako jamico na plošči odpipetiramo po 180 μl gojišča in z multikanalno avtomatsko pipeto s sterilnimi pipetnimi nastavki aseptično nacepimo izbran volumen vzorca (30 μl , 40 μl , 60 μl) v prvo kolono, zamenjamo nastavke, premešamo, in izbran volumen prenesemo v naslednjo kolono. Postopek ponovimo tako, da dobimo zelene stopnje razredčitve. Mikrotitrške plošče po nacepljanju inkubiramo v vlažni komori, da gojišča ne hlapijo iz jamic. Pri izračunu MPN pazimo na stopnje razredčitve (le-te niso nujno desetiške). Najbolj verjetno število mikrobov v vzorcu določimo z uporabo primernih statističnih tabel ali pa z MPN kalkulatorjem. MPN kalkulator je računalniški program, ki ga naložimo z interneta (na naslovu <http://www.cfsan.fda.gov/%7Eebam/bam-a2.html> na

dnu strani kliknemo na "Download an Excel spreadsheet to calculate values") v obliki Excelove tabele. V kalkulatorju v ustrezne stolpce vnesemo podatke o količini inokuluma v posamezni jamici, o številu jamic in o številu pozitivnih ponovitev. Na podlagi teh podatkov kalkulator izračuna MPN mikrobov v vzorcu.

Plinska kromatografija in merjenje produkcije CO₂

Kromatografske metode so vse tiste metode, ki ločujejo snovi med seboj na podlagi njihove porazdelitve med **stacionarno** in **mobilno fazo**. Posamezne komponente se med seboj ločujejo zaradi različnih afinitet do stacionarne in mobilne faze. Relativna hitrost potovanja v takem sistemu za določeni tip molekul je odvisna od časa, ki ga molekula prebije v mobilni fazi, in vpliva na kvaliteto ločitve. Več možnosti ko imajo komponente za porazdelitev med stacionarno in mobilno fazo, bolj učinkovito se ločijo.

Kombinacije stacionarne in mobilne faze glede na njuno agregatno stanje so lahko različne (najpogosteje trdno/tekoče, trdno/plinasto ali tekoče/tekoče).

Osnovne komponente plinskega kromatografa so **injektor**, **kolona**, **peč** za vzdrževanje in programiranje temperature kolone, **detektor**, in **oprema za procesiranje signala** (rekorder, integrator, PC). Rezultat analize je **kromatogram**, ki kaže intenziteto signala v odvisnosti od zadrževalnega časa komponente.

Ločitev snovi v koloni temelji na porazdelitvi med **tekočo stacionarno fazo**, ki je vezana na **trden nosilec**, in **plinasto mobilno fazo**, ki je običajno nek **inertni plin**. Le-ta se ne sme vezati na stacionarno fazo. Pogosto uporabljamo He, H₂, N₂, Ar in tudi mešanice (Ar-CH₄). Izbira plina je odvisna od vrste vzorca in detektorja.

Ločimo **polnjene** in **kapilarne kolone**. **Polnjene kolone** so običajno spiralno zvite cevi iz bakra, jekla ali stekla, napolnjene s stacionarno fazo ali inertnim nosilcem, ki je prevlečen s tekočo stacionarno fazo. Kolone lahko napolnimo tudi sami. Kolono predstavlja sistem cevk dolžine 0,5-20 m s premerom 0,3-0,5 cm. **Kapilarne kolone** so iz steklenih vlaken, ne vsebujejo polnila, stacionarna faza je nanešena na notranjo steno kapilare. Premer kapilare je 0,2-0,4 mm, dolžina pa od 10 do 300 m oz. za zelo fino ločevanje tudi do 2 km. V takem sistemu se snovi neprestano porazdeljujejo med stacionarno in plinasto fazo. Prednost teh kolon je izredno velika ločljivost in kratek čas analize. Pomanjkljivost kapilarnih kolon pa je analiza majhnih količin vzorca. Vzorec, ki mora biti kemično obstojen pri spremembah agregatnega stanja, uplinimo, in ga skupaj z nosilnim plinom uvajamo v kolono. Za plinsko kromatografijo so primerne snovi, ki so obstojne pri izbranih temperaturah (npr. $T_{\text{injektor}} = 400^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{kolona}} = 200^{\circ}\text{C}$). Na koncu posamezne komponente ločimo z detektorjem.

Detektor: toplotna prevodna celica (TCD detektor): ta tip detektorja meri toplotno prevodnost plinov in zaznava spremembe v električni upornosti, ki je odvisna od temperature. Iz kolone teče vzorec preko filamentov, ki so termostatirani in napajani s šibkim tokom. Če teče tok plina konstantno preko vroče žice z določeno temperaturo, se bo le-ta ohladila na temperaturo, ki je odvisna od hitrosti toka in toplotne prevodnosti plina. Pri konstantnem pretoku je sprememba odvisna zgolj od toplotne prevodnosti

plina, ki teče preko žice. Komponente iz vzorca povzročijo spremembo toplotne prevodnosti nosilnega plina, kar spremeni temperaturo filamentov. Načeloma je TCD uporaben za analizo vseh snovi, ki imajo toplotno prevodnost različno od nosilnega plina. Lahko se uporablja za analizo H₂, N₂, CO₂, O₂, N₂O in H₂S.

Detektorji nam pokažejo le časovni zamik, v katerem se posamezne komponente izločijo iz kolone, nič pa nam ne povedo o količini in naravi posameznih komponent. Za kvantitativno in kvalitativno analizo se zaradi tega navadno uporabljajo **standardi**, kar pa je možno le takrat, kadar vemo, kaj ločujemo. Kadar merimo CO₂, kromatograf stabiliziramo in ga umerimo s pomočjo zunanjega standarda z znano koncentracijo CO₂. Kadar uporabljamo TCD detektor, ki snovi ne uniči, lahko s kondenziranjem posameznih frakcij kromatografijo uporabimo tudi v preparativne namene.

Plinsko kromatografijo v analitiki uporabljamo za različne namene:

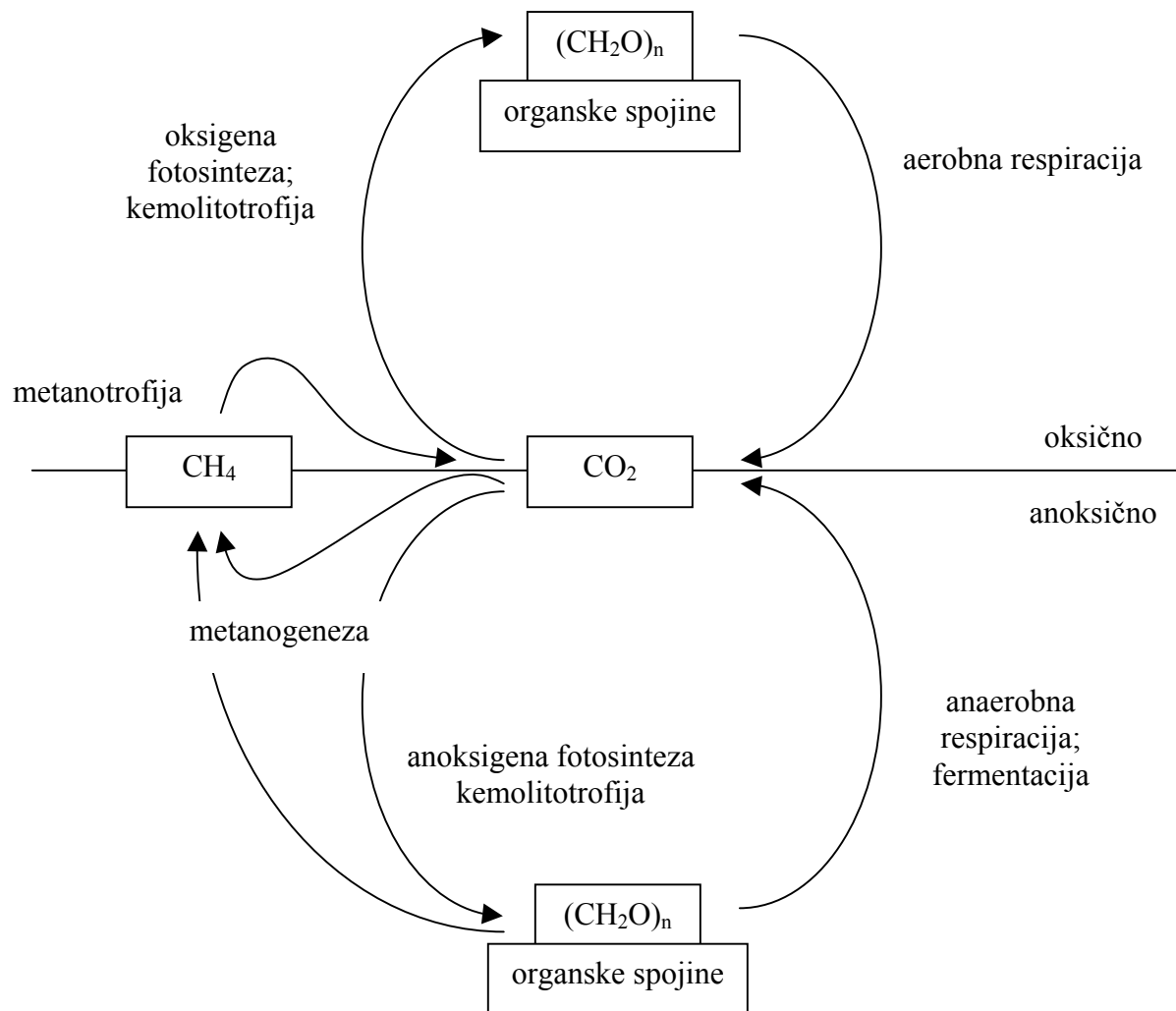
- **analiza celičnih komponent** za opis znanih ali taksonomijo neznanih bakterij (npr. profil dolgoveržnih maščobnih kislin "FAME")
- **analiza izvenceličnih metabolnih produktov** za ugotavljanje prisotnosti metabolnih skupin bakterij (npr. določanje CH₄ v gojišču, ki kaže na metanogence)
- **analiza katabolnih produktov** za detekcijo patogenov (če so specifični za patogene) ali za študijo metabolizma (npr. produkcija CO₂ kaže na heterotrofno aktivnost, z merjenjem produkcije CO₂ v določenih časovnih intervalih pa lahko ugotavljamo tudi hitrost respiracije)

Ob rezultatih analize podajamo tudi določene parametre: vrsto kromatografa, nosilni plin in hitrost pretoka, velikost in debelino kolone, temperaturni režim (izotermalni ali gradientni), temperature posameznih komponent, način detekcije oz. vrsto detektorja in vrsto standardizacije.

Parametri našega sistema za merjenje CO₂: plinski kromatograf HP 5890A, Porapak R kolona 180 cm, temperatura kolone 50°C, temperatura injektorja 100°C, temperatura detektorja 100°C, nosilni plin He, pretok nosilnega plina 180ml/min, TCD detektor, integrator HP 3392A.

MIKROBNE PRETVORBE OGLJIKA

Mikrobni procesi v kroženju ogljika:



Biogeokemijsko kroženje ogljika je v naravi osrednjega pomena. Vsa tkiva živih organizmov so sestavljena iz C in študij biogeokemičnega kroženja C je pokazatelj stanja biosfere. Fiksacija C v oksigenih fotoavtotrofih je v preteklosti ustvarila kisik v atmosferi.

Najpomembnejši tok v globalnem kroženju C je tisti, ki s **fotosintezo** povezuje atmosferski CO₂ (oksidirani C) z **organsko vezanim C** (reduciranim C). Obratni proces je oksidacija - **respiracija**. Tako je kroženje C povezano s kroženjem O v atmosferi. Anaerobni proces razgradnje organskega C poteka v obliki **anaerobne respiracije**, **fermentacije** in **metanogeneze**. Pri slednji nastaja **metan** kot produkt anaerobne respiracije in je CO₂ pogosto končni akceptor elektronov, H₂ pa donor elektronov. Večina nastalega metana izhaja iz anoksičnih okolij in ga oksidirajo **metanotrofi**.

Enostaven primer za kroženje ogljika je naslednji: CO₂ iz zraka v procesu fotosinteze asimilira zelena rastlina, ki ga z biosintezo prevede do celuloze. Po odmrtnosti rastline

celulozo razgradijo celulolitični mikroorganizmi. Produkt aerobne razgradnje ogljika iz celuloze je ogljik v CO₂ in ogljik v novo nastali biomasi (~ 50:50). Na ta način je del ogljika (ogljik v CO₂) naredil popolni krog.

Vaja 1: Založenost okolja s hranili in razgradnja celuloze

Celuloza je visokomolekularni v vodi netopni polimer glukoze, ki je v naravi vedno vezana z drugimi snovmi (npr. lignini). Prva stopnja razgradnje v aerobnih ali anaerobnih razmerah je depolimerizacija celuloze. Prvi v vodi topni produkt je disaharid celobioza. V celico lahko vstopa monomera glukoza, ki je izrabljena kot vir ogljika in energije za rast. Razgradnja sicer mikrobom dostopne organske snovi in rast celic je omogočena le v primeru, ko so poleg ogljika v neposrednem okolju prisotni vsi potrebni elementi v dostopnih oblikah. Pomanjkanje enega elementa omejuje rast in razgradnjo organskega substrata. Odsotnost elementa onemogoči rast.

Znano količino (~ 2 g) zračno suhe (z.s.) modelne celulozne snovi (filter papir) inkubiraj aerobno v epruveh 20 x 200 mm ob različni založenosti s hranili v vodni raztopini.

Varianta A: celuloza + 7 ml deionizirane vode + 1 ml talne suspenzije
(razredčitev 10^{-1})

Varianta B: celuloza + 2 ml deionizirane vode + 5 ml 10x razredčene raztopine soli (po Winogradskem) z dodanimi mikroelementi + 1 ml talne suspenzije (razredčitev 10^{-1})

Varianta C: celuloza + 1 ml deionizirane vode + 5 ml 10x razredčene raztopine soli (po Winogradskem) z dodanimi mikroelementi + 1 ml raztopine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 1 ml talne suspenzije (razredčitev 10^{-1})

Varianta D: enaka varianta kot C, le da jo avtoklaviramo

Po 7-tedenski inkubaciji ostanek celuloznega materiala posuši (do z. s. stopnje) in ugotovi spremembo teže med inkubacijo v posameznih variantah.

Osnovna raztopina soli (po Winogradskem):

K_2HPO_4	5,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0 g
NaCl	2,5 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	58,0 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	50,0 mg
deionizirana voda	1000,0 ml

Raztopina $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 3,75 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / ml

Tabela 2: Razlika v teži zračno suhega filter papirja (z.s.s.) v začetku in na koncu inkubacije pri različni založenosti s hranili.

Vzorec	Začetna teža snovi	Končna teža snovi	Razlika	Delež mineralizirane snovi (%)
	(mg z.s.s.)			
A				
B				
C				
D				

Vaja 2: Mineralizacija celuloze

Končni produkti aerobnega metabolizma celuloze so CO₂, H₂O in biomasa. Približno 50% substratnega ogljika, ki ga celica presnovi, zapusti celico v obliki CO₂. Pri anaerobnem metabolizmu je končnih produktov lahko več (npr. acetat, propionat, butirat, format). Redno se tudi v anaerobiozi pojavi CO₂, vendar je relativni delež tega odvisen od tipa metabolizma. Teoretsko je produkcija CO₂ v anaerobnih vzorcih manjša od produkcije CO₂ v aerobno inkubiranih vzorcih.

V serumske steklenice dodaj filter papir (~ 2 g), 40 ml deionizirane vode, 5 ml 10x razredčene raztopine soli (po Winogradskem) z dodanimi mikroelementi, 5 ml raztopine (NH₄)₂SO₄ in 1,5 ml talne suspenzije (razredčitev 10⁻¹). Posode zapri s plinotesnim zamaškom.

Varianta A: 500 ml steklenica - plinska faza je *zrak*

Varianta B: 125 ml steklenica - plinska faza je *He* oziroma *N₂*

Po 2-tedenski inkubaciji izmeri v obeh variantah količino nastalega CO₂ s plinskim kromatografom.

Z upoštevanjem raztopljenega CO₂ izračunaj celotno količino nastalega CO₂:

$$M = C_g \cdot (V_g + V_l \cdot \alpha)$$

kjer je: M celotna količina CO₂ v posodi, C_g izmerjena koncentracija CO₂ v plinski fazi, V_g volumen plinske faze, V_l volumen tekoče faze in α Bunsenov koeficient topnosti plinov, ki za CO₂ pri 25°C znaša 0,758. Zračni volumen 125-ml steklenice je približno 154 ml, pri 500-ml steklenici pa je približno 598 ml. Za izračun volumna plinske faze je potrebno od teh vrednosti odšteti volumen vsebine v posamezni steklenici.

Količina produciranega CO₂ po 2 tednih:

varianta A:

varianta B:

Vaja 3: Amiloliza - velikost združbe amilolitičnih mikroorganizmov

Škrob je razvejana molekula sestavljena iz amiloze in amilopektina. Prva stopnja razgradnje škroba je depolimerizacija s pomočjo amilaz. Najbolj verjetno število mikrobov z amilolitično sposobnostjo v vzorcu tal bomo določili z MPN metodo.

Tekoče selektivno gojišče z *amilozo* kot edinim virom energije in ogljika nacepimo z razredčitvami vzorca v osmih ponovitvah. Po inkubaciji ugotavljamo porabo škroba z jodovim reagentom (lugol).

Gojišče pripravimo v 250 ml erlenmajericah in avtoklaviramo 15 min pri 121°C. Na mikrotitrski plošče sterilno prenesemo po 180 µl ohlajenega gojišča in shranimo na 4°C do uporabe.

Velikost združbe pokaže biotično kapaciteto vzorca za izrabo tega v naravi razširjenega polimernega substrata.

Gojišče za amilolitične mikroorganizme:

razt. soli (po Winogradskem)	50,0 ml
talni ekstrakt	10,0 ml
amiloza	1,5 g
NH ₄ NO ₃	1,0 g
razt. mikroelementov	1,0 ml
deionizirana voda	1000,0 ml

Nacepljanje: V sterilno stekleno petrijevko prelij del vzorca in na multikanalni pipeti nastavi volumen na 20 µl. Zajemi vzorec in ga prenesi v prvo vrsto mikrotitrski plošče s tekočim selektivnim gojiščem z amilozo. Odrzki nastavke, vzemi sterilne in kontrolirano premešaj vsebino luknjic s počasnim pipetiranjem gor in dol (3x). Nato vsebino prenesi v naslednjo vrsto in odrzki nastavke.

Inkubacija: aerobna, v temi, vlažna komora, pri 28°C, 7 tednov.

Odčitavanje: V vsako jamico mikrotitrski plošče dodaj kapljico jodovice (lugol). Modra obarvanost pomeni prisotnost škroba (negativni primeri). Negativni test z jodovico pokaže pozitivne primere, to je nacepljena gojišča, v katerih je ves škrob porabljen (ni modre obarvanosti).

Iz razporeda + in - znakov ugotovimo karakteristično število mikroorganizmov in s pomočjo tabel ali MPN kalkulatorja najbolj verjetno število mikrobov v vzorcu tal.

MPN amilolitičnih mikroorganizmov v vzorcu tal:

Vaja 4: Učinkovitost mikrobne porabe škroba v aerobnih in anaerobnih pogojih

Škrob je za heterotrofne mikrobe vir energije in vir ogljika za gradnjo nove celične biomase. Od tipa energetskega metabolizma je odvisno prerazporejanje substratnega C v metabolne produkte in v novo sintetizirano mikrobno biomaso. Prirast biomase kompleksne mikrobne združbe pri razgradnji škroba bomo ugotavljali v odvisnosti od dostopnosti kisika.

Gojišče z amilozo kot edinim energetskim substratom nacepimo s talnim inokulumom in po inkubaciji merimo prirast biomase.

Varianta A: v 250 ml erlenmajerico dodaj 50 ml gojišča enake sestave kot pri prejšnji vaji, le da je količina amiloze 5 g/l. Gojišče inokuliraj z 1 ml suspenzije tal (redčitev 10^{-1}) in na stresalniku aerobno inkubiraj pri 28°C do popolne porabe škroba v gojišču (~ 1 teden).

Varianta B: v 150 ml serumsko steklenico dodaj 50 ml enakega gojišča (5 g amiloze/l). Gojišče inokuliraj z 1 ml suspenzije tal. Serumsko steklenico zapri z gumijastim zamaškom in zamenjaj atmosfero v steklenici s He ali N₂ ter inkubiraj pri 28°C do popolne porabe škroba v gojišču.

Prisotnost škroba v gojišču preverjamo z jodovico.

Določanje mikrobne biomase

Ko je porabljen ves organski substrat določimo količino nosintetizirane mikrobne biomase v vsaki varianti z merjenjem celičnega proteina z biuretno reakcijo.

Biuretna reakcija je značilna za peptide in proteine. V alkalnih pogojih nastane po dodatku CuSO₄ v raztopino proteina modro obarvan kompleks Cu²⁺ ionov s peptidnimi vezmi. Reakcija je primerna za določanje koncentracije proteinov v območju 1-10 mg/ml. Večina metod za določanje količine proteinov zahteva standardiziranje s čistim proteinom in za to navadno uporabljamo albumin iz govejega seruma (BSA – ang. "bovine serum albumin"): na seriji raztopin znanih koncentracij izvedemo reakcijo, izmerimo absorbenco pri določeni valovni dolžini in narišemo umeritveno krivuljo, ki podaja odvisnost absorbance od koncentracije proteina v vzorcu. Iz absorbance vzorca odčitamo vrednost za koncentracijo proteina na umeritveni krivulji.

Postopek za biuretno reakcijo:

- kulturo homogeniziraj z ultraturaksom
- centrifugiraj 30 ml kulture (15 000 rpm, 10 min)
- celice v usedlini operi s 5 ml 0,9% NaCl in ponovno centrifugiraj
- usedlino resuspendiraj v 3 ml 0,9% NaCl
- 2 ml suspenzije odpipetiraj v 10-ml stekleno centrifugirko; vzporedno delaj slepo probo, ki vsebuje 2 ml H₂O
- dodaj 1 ml 3M NaOH
- segrevaj 5 min v vodni kopeli pri 100 °C
- ohladi
- dodaj 1 ml 2,5% CuSO₄
- inkubiraj 5 min pri sobni T
- centrifugiraj 10 min pri 3000 rpm
- izmeri absorbanco supernatanta pri A₅₅₅ proti slepi probi
- na osnovi umeritvene krivulje za serumski albumin določi količino proteina v vzorcu

Količina celičnega proteina:

Varianta A:

Varianta B:

Iz podatkov o novonastali biomasi in porabljeni količini substrata izračunaj učinkovitost izrabe substrata in jo izrazi v:

- mg biomasnega proteina na mg substrata
- mg suhe snovi biomase na mg substrata (upoštevaj, da je delež proteina v suhi snovi biomase ~ 50%)
- mg suhe snovi biomase na mg substratnega ogljika
- mg biomasnega ogljika na mg substratnega ogljika (upoštevaj, da je delež ogljika v suhi snovi biomase ~ 50 %).

Tabela 3: Učinkovitost mikrobne porabe škroba.

Varianta	$\frac{\text{MB-protein}}{\text{substrat-s.s.}}$	$\frac{\text{MB-s.s.}}{\text{substrat-s.s.}}$	$\frac{\text{MB-s.s.}}{\text{substratni-C}}$	$\frac{\text{MB-C}}{\text{substratni-C}}$
	(mg/mg)			
A				
B				

Vaja 5: Proteoliza - velikost združbe proteolitičnih mikroorganizmov

Modelna snov je protein želatina. Protein je mikrobni celici vir energije, C, N, in S. Prva stopnja razgradnje želatine je depolimerizacija. Šele monomere lahko vstopajo neposredno v celični energetski in biosintetski metabolizem.

Selektivno gojišče z želatino kot edinim virom energije nacepi v treh ponovitvah z 0,5 ml razredčene suspenzije tal (razredčitve od 10^{-1} do 10^{-7}). Ne pozabi na kontrolni vzorec, ki je brez inokuluma.

Gojišče za proteolitične mikroorganizme:

razt. soli (po Winogradskem)	50,0 ml
želatina	30,0 g
razt. mikroelementov	1,0 ml
deionizirana voda	1000,0 ml

Nacepljena gojišča aerobno inkubiraj 6 tednov pri 28°C.

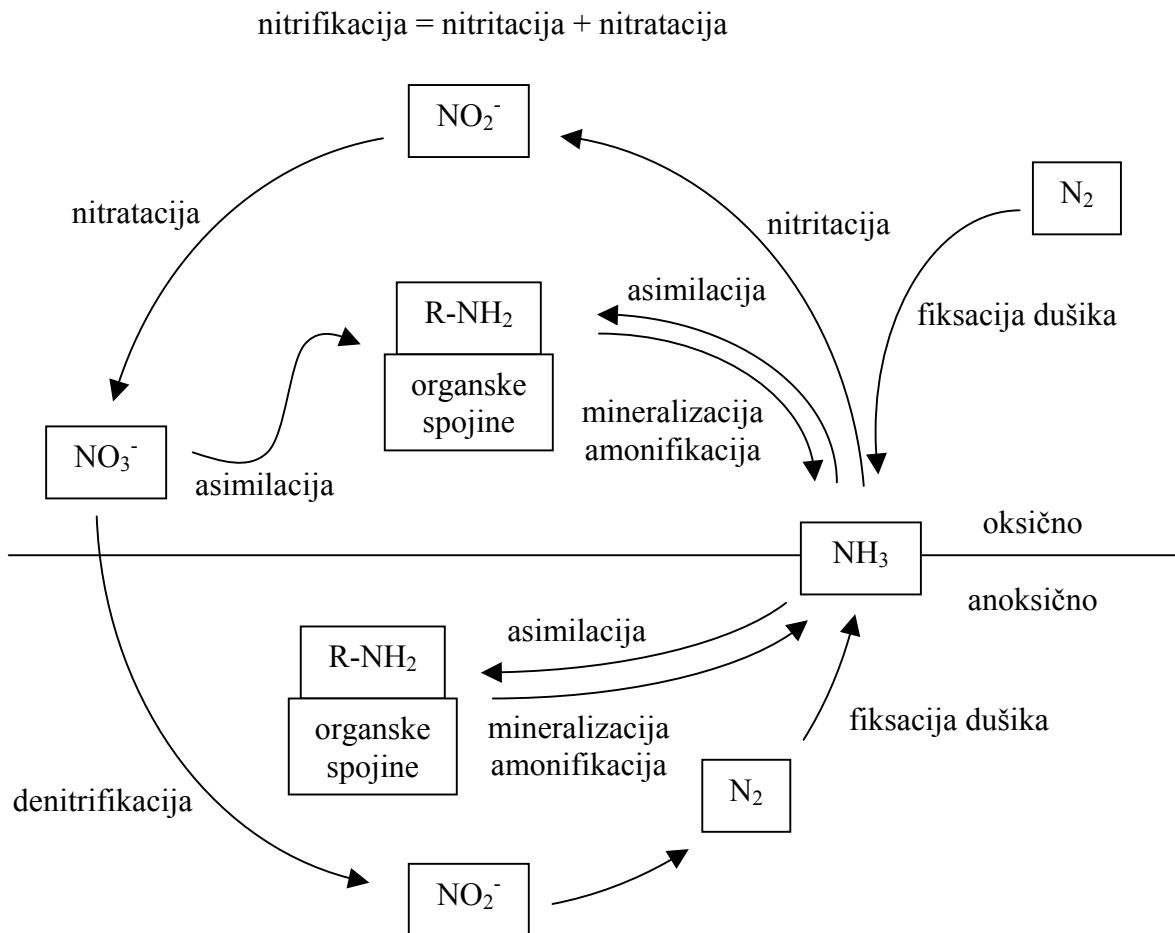
Po inkubaciji odčitaj pozitivne primere. Pozitivni primeri so utekočinjena gojišča pri temperaturi pod 22°C.

Iz razporeda + in - znakov določi karakteristično število in iz Mc Crady-jeve tabele z upoštevanjem razredčitve odčitaj najbolj verjetno število mikrobov, ki so sposobni proteolitične aktivnosti.

MPN proteolitičnih mikrobov v vzorcu tal:

MIKROBNE PRETVORBE DUŠIKA

Mikrobni procesi v kroženju dušika:



Dušik je esencialna sestavina proteinov in DNA. Biogeokemijsko so pomembne predvsem anorganske spojine: NH_3 (oz. NH_4^+ , odvisno od pH), N_2 , NO_2^- , NO_3^- . Atmosfera je največji rezervoar N, kjer je le-ta večinoma prisoten kot N_2 . Drugod je N anorgansko in organsko vezan. Atmosferski N_2 mnogim organizmom ni na razpolago zaradi močne kemijske vezi v molekuli N_2 . Atmosferski N se **reducira** do NH_3 z mikrobno **fiksacijo N**, ki je bistvena za vračanje N v sistem, ker zaradi **denitrifikacije** le-ta uhaja v atmosfero. Fiksacijo N_2 katalizira encim nitrogenaza, ki je prisoten le v prokariontih. Nitrogenaza je občutljiva za O_2 . Organizmi, ki **asimilirajo** anorganske oblike (NH_4^+ in NO_3^-), vgradijo N v organske spojine. NH_4^+ je adsorbiran na negativno nabite minerale glin in je težje dostopen od NO_3^- . **Asimilativna redukcija nitrata** je proces redukcije NO_3^- v NH_4^+ , ki se asimilira v biomaso. Najpomembnejši naravni proces nastanka NO_3^- v tleh in vodah je bakterijska **oksidacija** reduciranih N-spojnin – **nitrifikacija**. Poteka v dveh stopnjah: oksidacija NH_3 do NO_2^- (**nitritacija**) in oksidacija NO_2^- do NO_3^- (**nitratacija**). Večina nitrifikacijskih bakterij oksidira amoniak, nekatere pa oksidirajo amonijev ion. Oksidacija NH_3 najboljše poteka v rahlo alkalnem okolju. Oksidacija NH_4^+ lahko poteka tudi anaerobno in je NO_2^- akceptor

elektronov (ang. "*anoxic ammonia oxidation* – **anammox**").

Organsko vezani N v odmrlih organizmih je dostopen drugim organizmom. Proces razgradnje organsko vezanega N do anorganskega NH_4^+ imenujemo **amonifikacija** ali **mineralizacija** (npr. deaminacija aminokislin, hidroliza uree, ipd.). Sproščeni N predstavlja višek za rastne potrebe mikroba, količina le-tega je odvisna od C:N razmerja. Nastali NH_3 se vrača v atmosfero ali pa v obliki NH_4^+ ostaja vezan v tleh in je dostopen za asimilacijo ali za nitrifikacijo. Večji del N (NO_3^-) v tleh in vodah se vrača v atmosfero z **disimilativno redukcijo nitrata** do N_2 – **denitrifikacijo**. Denitrifikacija poteka večinoma v hipoksičnih ali anoksičnih okoljih, je pa proces toleranten do O_2 . Denitrifikacijo vršijo heterotrofni fakultativni anaerobi. Akceptorja elektronov sta pogosto NO_3^- ali NO_2^- . Nekatere bakterije vršijo redukcijo NO_3^- v NH_4^+ v procesu **asimilativne redukcije nitrata**. Poznamo pa tudi **disimilativno redukcijo nitrata** do **amonija**, pri kateri se nastali amonij izloči iz celice.

Vaja 6: Mineralizacija dušika - velikost mikrobne združbe

Večinska zaloga dušika v ekosistemih je v organsko vezani obliki. V procesu mineralizacije heterotrofi sproščajo dušik v okolje v anorganski obliki (amonijev ion). Primarna tarča mikrobov v razgradnji organske snovi so ogljikove komponente, v okolje sproščeni anorganski N pa predstavlja višek N za rastne potrebe udeleženih organizmov.

Tekoče selektivno gojišče z argininom kot edinim virom energije, ogljika in dušika (ozko razmerje C:N) nacepimo z ustreznimi razredčitvami vzorca v osmih ponovitvah. Po inkubaciji ugotavljamo prisotnost amonijskega dušika v gojiščih z Neslerjevim reagentom.

Gojišče za mineralizacijo dušika:

razt. soli (po Winogradskem)	50,0 ml
arginin	0,2 g
razt. mikroelementov	1,0 ml
deionizirana voda	1000,0 ml

Gojišče pripravimo v 250 ml erlenmajericah in avtoklaviramo 15 min pri 121°C. Na mikrotitrski plošči sterilno prenesemo po 180 µl ohlajenega gojišča in shranimo na 4°C do uporabe.

Nacepljanje: V sterilno stekleno petrijevko prelij del vzorca in na multikanalni pipeti nastavi volumen na 20 µl. Zajemi vzorec in ga prenesi v prvo vrsto mikrotitrski plošče s tekočim selektivnim gojiščem z argininom. Odvrzi nastavke, vzemi sterilne in kontrolirano premešaj vsebino luknjic s počasnim pipetiranjem gor in dol (3x). Nato vsebino prenesi v naslednjo vrsto in odvrzi nastavke.

Inkubacija: Aerobno, v vlažni komori, pri 28°C, 7 tednov.

Odčitavanje: Z Nesslerjevim reagentom dokazujemo pojavljanje amonijevega iona. V vsako jamico mikrotitrski plošče dodaj nekaj kapljic Nesslerjevega reagenta. Pojav oranžne obarvanosti oz. oranžne oborine dokazuje prisotnost amonijevega iona v vzorcu, to je pozitivne primere. Iz razporeda + in - znakov ugotovi karakteristično število in s pomočjo tabel ali kalkulatorja MPN odčitaj najbolj verjetno število mikrobov, ki so udeleženi v mineralizaciji argininskega N. Podatek pokaže velikost mikrobne združbe za mineralizacijo organskega N iz arginina v izbranem vzorcu tal.

MPN amonifikatorjev v vzorcu tal:

Vaja 7: Nitrifikacija - velikost združbe nitrifikatorjev

Nitrifikacija je biotična oksidacija amonija do nitrata, ki je najbolj mobilna oblika vezanega dušika. Za nitrifikatorje je značilna majhna hitrost rasti. Zaradi relativno malo sproščene energije v teh oksidacijah, je značilna tudi velika poraba energetskega substrata ob skromni prirasti bakterijske biomase. Obseg in hitrost nitrifikacije sta v veliki meri odvisna od velikosti udeležene združbe mikrobov, ki so sposobni oksidacije amonija. Velikost združbe mikrobov v vzorcu lahko izmerimo z metodo MPN.

Tekoče gojišče z amonijem kot virom energije nacepimo z razredčitvami vzorca v osmih ponovitvah. Po inkubaciji ugotavljamo prisotnost nitrita in nitrata. Reagent za določevanje nitrita vsebuje sulfanilamid in naftiletildiamin (SA + NEDA), ki v reakciji z nitritom daje rdeče obarvano azo-spojino. Nitrat lahko s pomočjo cinka reduciramo do nitrita, ki ga določimo s SA + NEDA reagentom.

Gojišče za nitrifikatorje:	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (5,0g/100ml)	10 ml
CaCl ₂ • 2H ₂ O (1,34g/100ml)	1.0 ml
MgSO ₄ • 7H ₂ O (4,0g/100ml)	1.0 ml
bromtimol modro (0,04g/100ml)	5.0 ml
KH ₂ PO ₄ (0,2 M)	7.5 ml
kelirano Fe	1.0 ml
mikroelementi	1.0 ml
deionizirana voda	1000,0 ml

Pred avtoklaviranjem uravnamo še pH z 2% K₂CO₃ na 7,0 – 7,2. Gojišče pripravimo v 250 ml erlenmajericah in avtoklaviramo 20 min pri 121°C. Na mikrotitrne plošče sterilno prenesemo po 180 µl ohlajenega gojišča in shranimo na 4°C do uporabe.

Nacepljanje: V sterilno stekleno petrijevko prelij del vzorca in na multikanalni pipeti nastavi volumen na 40 µl. Zajemi vzorec in ga prenesi v prvo vrsto mikrotitrne plošče s tekočim selektivnim gojiščem. Odvrzi nastavke, vzemi sterilne in kontrolirano premešaj vsebino luknjic s počasnim pipetiranjem gor in dol (3x). Nato vsebino prenesi v naslednjo vrsto in odvrzi nastavke.

Inkubacija: aerobno, vlažna komora, pri 28°C, 7 tednov.

Odčitavanje: z reagentom, ki vsebuje SA + NEDA dokaži pojavljanje nitrita in nitrata. V vsako jamico mikrotitrne plošče dodaj nekaj kapljic reagenta. Roza obarvanost dokazuje prisotnost nitrita. Ker je z dodatkom Zn v prahu možna kemijska redukcija nitrata do nitrita, lahko po dodatku Zn dokažemo tudi nitrat (roza obarvanost). Najprej dodaj SA + NEDA, šele nato dodaj Zn. Pozitivni primeri so nacepitive, ki vsebujejo nitrit in nitrat. Iz razporeda + in - znakov ugotovi karakteristično število in s pomočjo tabel najbolj verjetno število mikrobov v vzorcu, ki so sposobni nitrifikacije.

MPN nitrifikatorjev v vzorcu tal:

Vaja 8: Vpliv kisika na nitrifikacijo

Uporabi enako gojišče kot pri vaji 7, vendar pripravljeno v epruveh za anaerobno gojenje.

Gojišče nacepi s suspenzijo tal (1 ml), plinotesno zapri in atmosfero zamenjaj s He. Kontrola je enako nacepljeno gojišče, inkubirano v prisotnosti zraka.

Po 7 tednih inkubacije pri 28°C preveri nastanek nitrita in/ali nitrata (reagent SA + NEDA, oziroma SA + NEDA + Zn).

Nitrifikacija v:

aerobni kontroli:

anaerobnem vzorcu:

Vaja 9: Vloga pH pri nitrifikaciji

Mineralno gojišče z amonijem in znižanim pH na 3-4 nacepi s talno suspenzijo (1 ml). Kontrolo predstavlja gojišče z nevtralno reakcijo prav tako nacepljeno s talno suspenzijo.

Po 6 tednih aerobne inkubacije pri 28°C preveri nastanek nitrita oz. nitrata (reagent SA + NEDA, oziroma SA + NEDA + Zn).

Nitrifikacija v:

kontroli z nevtralnim pH:

v vzorcu s pH 3 - 4:

Vaja 10: Denitrifikacija - velikost združbe denitrifikatorjev

Od abiotskih dejavnikov na proces najbolj vplivajo prisotnost kisika, prisotnost organske snovi, in koncentracija nitrata. Pri konstantnih razmerah abiotskega okolja so za potek denitrifikacije pomembni tudi biotski dejavniki, med njimi velikost denitrifikacijske združbe, ki jo lahko vrednotimo z MPN metodo.

Tekoče gojišče z nitratom ter acetatom, sukcinatom in NB (Nutrient broth) kot viri energije in ogljika nacepimo z razredčitvami vzorca v osmih ponovitvah. Po inkubaciji najprej določimo obseg združbe anaerobnih bakterij z ugotavljanjem motnosti na dnu mikrotirskih plošč. Šele nato določimo prisotnost nitrita.

Gojišče za denitrifikatorje:

NB (Nutrient broth, Difco)	1 g
KNO ₃	0,5 g
Na - acetat	0,5 g
Na - sukcinat	0,5 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	1 g
CaCl ₂	0,05
K ₂ HPO ₄	0,14 g
KH ₂ PO ₄	0,02 g
deionizirana voda	1000ml

Gojišče (pH 6,5) pripravimo v 250 ml erlenmajericah in avtoklaviramo 15 min pri 121°C. Na mikrotitrne plošče sterilno prenesemo po 180 µl ohlajenega gojišča in shranimo na 4°C.

Nacepljanje: V sterilno stekleno petrijevko prelij del vzorca in na multikanalni pipeti nastavi volumen na 30 µl. Zajemi vzorec in ga prenesi v prvo vrsto mikrotitrne plošče s tekočim selektivnim gojiščem za denitrifikatorje. Odvrzi nastavke, vzemi sterilne in kontrolirano premešaj vsebino luknjic s počasnim pipetiranjem gor in dol (3x). Nato vsebino prenesi v naslednjo vrsto in odvrzi nastavke.

Inkubacija: V anaerobnem loncu z N₂ atmosfero, pri 28°C, 6 tednov.

Odčitavanje: Z reagentom (SA+NEDA) dokaži pojavljanje nitrita oz. neporabljeni nitrat (po predhodni redukciji nitrata v nitrit s Zn v prahu). V vsako jamico mikrotitrne plošče dodaj kapljico reagenta. Rdeča obarvanost dokazuje prisotnost nitrita. V primerih, ko nitrit ni prisoten, preveri še prisotnost nitrata. Pozitivni primeri so epruvete, ki vsebujejo nitrit in epruvete, v katerih ni niti nitrita niti nitrata. Iz razporeda + in - znakov ugotovi karakteristično število in s pomočjo tabel najbolj verjetno število mikrobov v vzorcu, ki so sposobni disimilativne porabe nitrata.

Podatek pokaže biotični potencial tal za denitrifikacijo.

MPN denitrifikatorjev v vzorcu tal:

Vaja 11: Denitrifikacija pri standardni “aerobni” inkubaciji

Standardno aerobno namnoževanje mikrobnih kultur običajno izvajamo na stresalniku (100 do 200 obr/min) v posodah z vatnimi ali kovinskimi zamaški, ki omogočajo izmenjavo plinov. Zastavlja se vprašanje, ali tako namnoževanje omogoča zadostno oskrbo vseh celic v kulturi s kisikom in prepreči uveljavljanje alternativnih dihalnih poti.

Enako gojišče kot pri vaji 10, nacepimo s suspenzijo tal.

Varianta A: V 250 ml erlenmajerico dodaj 50 ml gojišča + 1 ml suspenzije tal. Aerobno inkubiraj 6 tednov na stresalniku pri 28°C v temi.

Varianta B: V 150 ml penicilinko dodaj 50 ml gojišča + 1 ml suspenzije tal. Plinsko fazo zamenjaj s He ali N₂ in inkubiraj na stresalniku 6 tednov pri 28°C v temi.

Po 6 tednih ugotovi porabo nitrata (reagent SA + NEDA + Zn).

Denitrifikacija:

varianta A:

varianta B:

Vaja 12: Talna pogača

Tla so primeren substrat za rast bakterije *Azotobacter*, ki je prosto živeči aerobni fiksator dušika (N₂). Talna pogača je vzorec primerno navlaženih tal z zglajeno površino v petrijevki. Če je vzorec tal naseljen z bakterijo *Azotobacter* in nudi pogoje za rast te bakterije, lahko njeno prisotnost odkrijemo z razvojem kolonij na površini pogače.

Priprava pogače: v čašo zatehtaj 50g tal in dodatke, ki so navedeni v nadaljevanju. Vzorce navlaži in dobro premešaj ter jih prenesi v petrijevke. Površino talnih vzorcev zgladi z objektnim stekelcem; za lažje glajenje površine po potrebi dodaj deionizirano vodo.

<i>Varianta A:</i>	tla (kontrola)
<i>Varianta B:</i>	tla + 1 % glukoza
<i>Varianta C:</i>	tla + 1 % glukoza + 2 % CaCO ₃
<i>Varianta D:</i>	tla + 1 % glukoza + 0,5 % K ₂ HPO ₄
<i>Varianta E:</i>	tla + 1 % glukoza + 2 % CaCO ₃ + 0,5 % K ₂ HPO ₄

Inkubiraj 4 dni v vlažni komori pri 28°C.

Po inkubaciji se pojavijo na površini posameznih pogač drobne (1 mm), bele, bleščeče kolonije bakterije *Azotobacter*. Stare kolonije so zaradi pigmenta rjave.

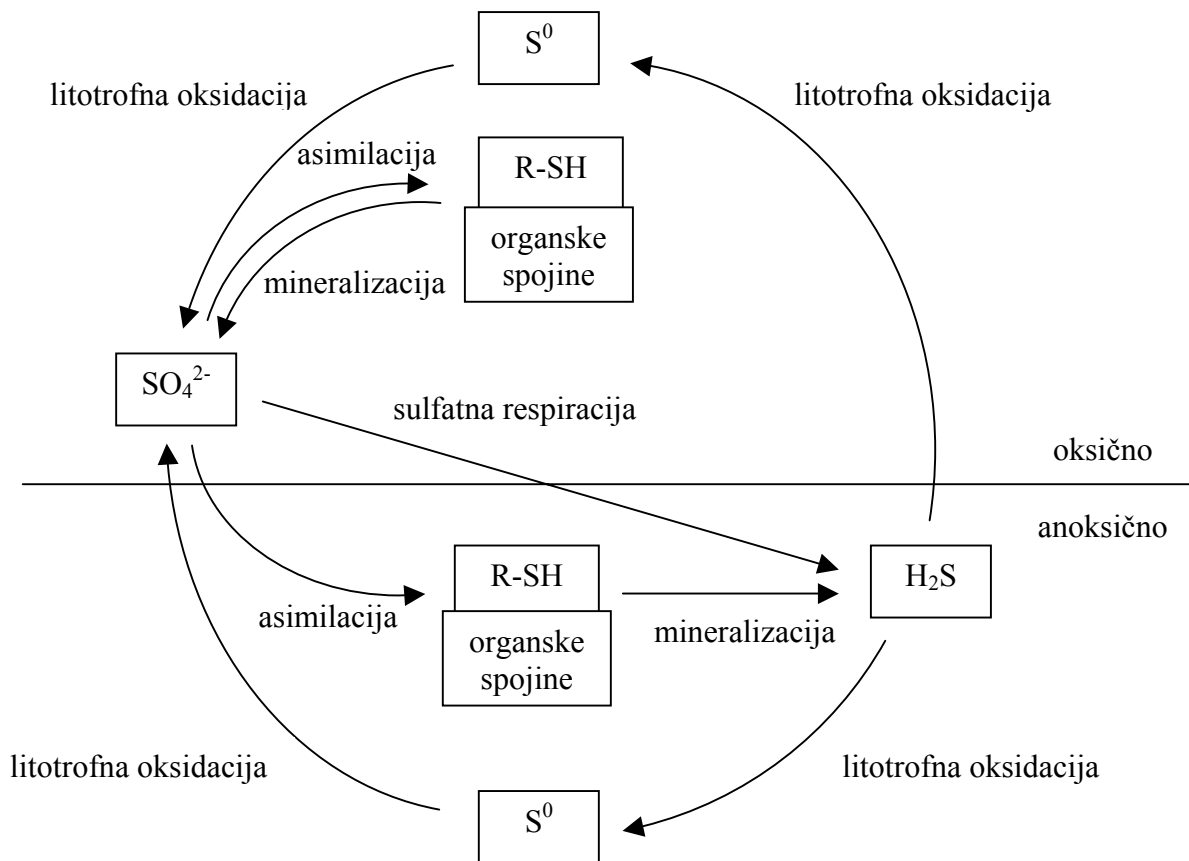
Test pokaže prisotnost bakterije v tleh in tudi založenost tal z uporabljenimi hranili za rast bakterije *Azotobacter*.

Rast kolonij bakterije *Azotobacter*:

<i>Varianta A:</i>
<i>Varianta B:</i>
<i>Varianta C:</i>
<i>Varianta D:</i>
<i>Varianta E:</i>

MIKROBNE PRETVORBE ŽVEPLA

Mikrobni procesi v kroženju žvepla:



Žveplo je esencialna sestavina proteinov. Aminokislina cistein ima -SH skupino, ki tvori z -SH skupino druge molekule cisteina disulfidne mostičke, ki stabilizirajo ali povezujejo molekule proteinov. Največ naravnega S je v obliki mineralov, npr. pirita (FeS_2). Ko organizmi **asimilirajo sulfat**, ga reducirajo v **sulfid** in nato vgradijo v organske spojine (aminokislina, kofaktorje). Proces je **asimilativna redukcija sulfata**. Sulfatni reducenti so striktni anaerobi, so pa lahko avtotrofi (donor e^- je H_2) ali heterotrofi (donorji so laktat, acetat, etanol, ipd.). **Disimilativna redukcija sulfata** poteka v anaerobnem okolju. Produkt je **H_2S** , ki izhaja kot plin, ali pa v prisotnosti kovin tvori slabo topne **kovinske sulfide** (npr. FeS). V aerobnih razmerah se pri nevtralnem pH H_2S spontano oksidira, mikrobna oksidacija sulfida pa je intenzivna kvečjemu na interfazi med oksičnim in anoksičnim okoljem.

Mikrobna oksidacija H_2S lahko poteka aerobno ali anaerobno, avtotrofno, heterotrofno ali miksotrofno. Oksidacija lahko poteka vse do **sulfata**, ali pa le do **elementarnega žvepla**. Pri anaerobni oksidaciji **sulfida** je lahko akceptor elektronov **nitrat**. Anaerobne avtotrofne žveplave bakterije oksidirajo sulfid do **S** (fototrofi) ali do **SO_4^{2-}** (kemotrofi). **Mineralizacija** organsko vezanega S poteka aerobno ali anaerobno; v anaerobnih pogojih nastaja **H_2S** , ki nastaja tudi med redukcijo sulfata (glej zgoraj); v aerobnih pogojih je končni produkt mineralizacije žvepla **SO_4^{2-}** .

Vaja 13: Anaerobna mineralizacija organskega žvepla - velikost mikrobne združbe

Pri mikrobni izrabi organskih žveplovih snovi v anaerobnih razmerah se višek žvepla sprošča v okolje večinsko v obliki H_2S . Ta produkt je močno reaktiven in reagira s kovinami v okolju v slabo topne ali netopne sulfide.

Tekoče gojišče, ki vsebuje organsko vezano žveplo (cistein) in železov amon citrat nacepimo z razredčitvami vzorca v osmih ponovitvah (MPN metoda). Po inkubaciji ugotavljamo prisotnost črne oborine železovega sulfida.

Gojišče pripravimo v 250 ml erlenmajericah in avtoklaviramo 15 min pri $121^{\circ}C$. Na mikrotitrski plošče sterilno prenesemo po 100 μl ohlajenega gojišča in shranimo na $4^{\circ}C$ do uporabe.

Nacepljanje: V sterilno stekleno petrijevko prelij del vzorca in na multikanalni pipeti nastavi volumen na 100 μl . Zajemi vzorec in ga prenesi v prvo vrsto mikrotitrski plošče s tekočim selektivnim gojiščem. Odrzi nastavke, vzemi sterilne in kontrolirano premešaj vsebino luknjic s počasnim pipetiranjem gor in dol (3x). Nato vsebino prenesi v naslednjo vrsto in odrzi nastavke.

Inkubacija: Anaerobno (anaerobni lonec z atmosfero N_2), pri $28^{\circ}C$, 6 tednov.

Odčitavanje: prisotnost črne oborine železovega sulfida kaže pozitivne primere. Iz razporeda + in - znakov ugotovimo karakteristično število in s pomočjo tabel ali kalkulatorja MPN najbolj verjetno število mikrobov v vzorcu, ki anaerobno mineralizirajo žveplo v anaerobiozi do H_2S .

Gojišče za mineralizacijo organskega žvepla:

NH_4Cl	1,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,13 g
Na-laktat 50%	6,2 ml
cistein	1,0 g
Fe-amonijski citrat	0,5 g
talni ekstrakt	20,0 ml
deionizirana voda	1000,0 ml

MPN anaerobnih mineralizatorjev žvepla v vzorcu tal:

Vaja 14: Sulfatna respiracija - velikost mikrobne združbe

Tekoče gojišče z laktatom, železovim amon citratom in sulfatom nacepimo z razredčitvami vzorca v osmih ponovitvah (MPN metoda). Po inkubaciji ugotavljamo prisotnost črne oborine železovega sulfida.

Gojišče pripravimo v 250 ml erlenmajericah in avtoklaviramo 15 min pri 121°C. Na mikrotitrski plošče sterilno prenesemo po 100 µl ohlajenega gojišča in shranimo na 4°C.

Nacepljanje: V sterilno stekleno petrijevko prelij del vzorca in na multikanalni pipeti nastavi volumen na 100 µl. Zajemi vzorec in ga prenesi v prvo vrsto mikrotitrski plošče s tekočim selektivnim gojiščem za sulfatno respiracijo. Odvrzi nastavke, vzemi sterilne in kontrolirano premešaj vsebino luknjic s počasnim pipetiranjem gor in dol (3x). Nato vsebino prenesi v naslednjo vrsto in odvrzi nastavke.

Inkubacija: Anaerobno (anaerobni lonec z atmosfero N₂), pri 28°C, 6 tednov.

Odčitavanje: Pojav črne oborine železovega sulfida kaže pozitivne primere. Iz razporeda + in - znakov ugotovi karakteristično število in s pomočjo tabel ali kalkulatorja MPN najbolj verjetno število sulfatnih respiratorjev v vzorcu.

Gojišče za sulfatne respiratorje:

NH ₄ Cl	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	4,1 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,13 g
Na-laktat 50%	6,2 ml
Fe-amonijski citrat	0,5 g
deionizirana voda	1000,0 ml

MPN sulfatnih respiratorjev v vzorcu tal:

Vaja 15: Sulfatna respiracija pri standardni “aerobni” inkubaciji

Preverjali bomo morebitno pojavljanje anaerobnih niš v tekoči kulturi pri standardni aerobni inkubaciji (glej tudi vajo 11).

Enako gojišče kot pri vaji 14 nacepi s suspenzijo tal.

Varianta A: V 250 ml erlenmajerico dodaj 50 ml gojišča + 1 ml suspenzije tal. Aerobno inkubiraj na stresalniku.

Varianta B: V 150 ml penicilinko dodaj 50 ml gojišča + 1 ml suspenzije tal. Posodo plinotesno zapri z gumijastim zamaškom in zamenjaj plinsko fazo s He ali N₂.

Po 6 tednih inkubacije opazuj pojavljanje črne oborine fero sulfida.

Varianta A:

Varianta B:

Tabela 4: Velikost združbe heterotrofov, amilolitičnih mikroorganizmov, proteolitičnih mikroorganizmov, nitrifikatorjev, denitrifikatorjev, naerobnih mineralizatorjev žvepla in sulfatnih respiratorjev v vzorcu obdelovanih tal. Število je izraženo na g zračno suhih tal.

Združba	Število mikroorganizmov (MPN)
amilolitični mikroorganizmi	
aerobni mineralizatorji dušika	
nitrifikatorji	
denitrifikatorji	
proteolitični mikroorganizmi	
anaerobni mineralizatorji žvepla	
sulfatni respiratorji	

MPN - Mc Crady-jeva tabela za 3 ponovitve

<i>Karakter.</i> <i>št.</i>	<i>Št.</i> mikrobov	<i>Karakter.</i> <i>št.</i>	<i>Št.</i> mikrobov	<i>Karakter.</i> <i>št.</i>	<i>Št.</i> mikrobov
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

LITERATURA

1. Atlas, R. M., Bartha, R., (1998) *Microbial Ecology; Fundamentals and Applications*, Fourth Edition, Benjamin/Cumming Science Publishing, Menlo Park.
2. Burlage, R. S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, G., Saylor, G., (1998) *Techniques in Microbial Ecology*, Oxford University Press, New York, Oxford.
3. Cappuccino, J. G., Sherman, N., (1996) *Microbiology; A Laboratory Manual*, Fourth Edition, The Benjamin, Cummings Publishing Company, Menlo Park.
4. Gerhard, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., Krieg, N. R., (1994) *Methods for General and Molecular Bacteriology*, ASM Press, Washington, D.C.
5. Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D., Walter M. V., (1997) *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Washington, D.C.
6. Kassem, A., Nannipieri, P., (1995) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, London.
7. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., (1997) *Brock Biology of Microorganisms*, Eight Edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
8. Phillips, J. A., Brock, T. D., (1991) *Laboratory Manual; Biology of Microorganisms*. Sixth Edition, Prentice Hall, New Jersey.

PRILOGA: Razporeditev vaj po terminih in po skupinah

1. Termin

vaja	št.
Založenost okolja s hranili in razgradnja celuloze	1
Mineralizacija celuloze	2
Amiloliza – velikost združbe amilolitičnih mikroorganizmov	3
Učinkovitost mikrobne porabe škroba	4
Mineralizacija dušika – velikost mikrobne združbe	6
Nitrifikacija – velikost mikrobne združbe nitrifikatorjev	7
Vpliv kisika na nitrifikacijo	8

2. Termin

vaja	št.
Proteoliza – velikost združbe proteolitičnih mikroorganizmov	5
Vloga pH pri nitrifikaciji	9
Denitrifikacija – velikost združbe denitrifikatorjev	10
Denitrifikacija pri standardni »aerobni« inkubaciji	11
Talna pogača	12
Anaerobna mineralizacija organskega žvepla – velikost mikrobne združbe	13
Sulfatna respiracija – velikost mikrobne združbe	14
Sulfatna respiracija pri standardni »aerobni« inkubaciji	15

3. Termin

Plinska kromatografija; določanje CO₂ pri vaji o razgradnji celuloze.

4. Termin

Določanje rezultatov posameznih inkubacij in razprava o dobljenih rezultatih.

Razporeditev vaj po skupinah:

1. Termin:

I. skupina	II. skupina	III. skupina	IV. skupina	V. skupina
1	1			
2	2	2	2	2
3				
		4	4	
				6
		7		
	8		8	8

2. Termin:

I. skupina	II. skupina	III. skupina	IV. skupina	V. skupina
9	9			
			10	
		11		11
		12		12
	5			
13				
			14	
15	15			